

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

| | | | |
|-------|--|---------|-------------|
| 学位記番号 | 医博第 467号 | 学位授与年月日 | 平成18年 3月15日 |
| 氏 名 | 仲 野 友 康 | | |
| 論文題目 | Endoplasmic reticulum Ca ²⁺ depletion induces endothelial cell apoptosis independently of caspase-12 (小胞体カルシウム枯渇はカスパーゼ12非依存的に血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する) | | |

博士(医学) 仲 野 友 康

論文題目

Endoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion induces endothelial cell apoptosis independently of caspase-12

(小胞体カルシウム枯渇はカスパーゼ12非依存的に血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

小胞体は、細胞内カルシウムイオン貯蔵部位として細胞内カルシウム濃度の調節に関与するとともに、タンパク質の高次構造形成や成熟化の場として細胞機能の発現・維持において重要な役割を果たしている。最近カルシウム過負荷や Ca^{2+} -ATPase阻害薬であるサブシガージン投与、あるいは低グルコース状態により、小胞体におけるタンパク質の成熟化が阻害され、異常タンパク質が蓄積し、小胞体分子シャペロン遺伝子の転写誘導やmRNAの翻訳効率の低下、さらにアポトーシスを生じることが、小胞体ストレス応答として知られている。小胞体ストレスは、主にアルツハイマー病などの神経変性疾患の病因として注目されているが、血管内皮細胞で生じた場合には、高血圧や動脈硬化などの強力な誘導因子となることが示唆されている。小胞体ストレス応答時にカスパーゼ12が活性化し、アポトーシスを惹起することが報告されているが、細胞内カルシウム調節系のどのような破綻が関与するのかについては明らかでない。

本研究では、血管内皮細胞の小胞体ストレスおよびアポトーシス出現の開始点となる細胞内カルシウム制御系を同定し、カスパーゼ12活性化との関連を明らかにすることを目的とした。

〔材料ならびに方法〕

対象としてブタ下行大動脈から分離培養した血管内皮細胞を用いた。細胞内カルシウムイオン濃度はFura-2/AMを用い測定した。アポトーシスはDNAの断片化をDNAラダー法により評価し、カスパーゼの活性化は、ウエスタンブロット法およびデンストメトリーにより解析した。

〔結果〕

- (1) サブシガージン ($5\mu\text{M}$) により細胞内カルシウム濃度は上昇し、カスパーゼ12の活性化とアポトーシスの出現が認められた。
- (2) ブラジキニン (10nM) は、細胞内カルシウム濃度を上昇させたが、カスパーゼ12の活性化もアポトーシスも生じなかった。しかし、血管内皮細胞を Ca^{2+} のキレート剤であるBAPTA/AM ($100\mu\text{M}$) で前処置し、ブラジキニンを投与すると、小胞体の持続したカルシウム枯渇を生じ、アポトーシスの出現が認められたが、カスパーゼ12の活性化は認められなかった。
- (3) カルパイン阻害剤であるMDL28170 ($120\mu\text{M}$) 存在下では、サブシガージン投与時のカスパーゼ12の活性化は抑制されたが、アポトーシスは出現した。非選択的なカスパーゼ阻害剤であるz-VAD.fmk ($100\mu\text{M}$) 存在下で、サブシガージン投与時のカスパーゼ12の活性化とアポトーシスは、ともに抑制された。
- (4) BAPTA/AM ($100\mu\text{M}$) の前処置下でブラジキニン刺激を行った際に生じるカスパーゼ12非依存的なア

ポトーシスもz-VAD.fmk(100 μ M)は抑制した。

〔考察〕

血管内皮細胞におけるアポトーシスの出現には、細胞内カルシウム濃度の上昇よりも、小胞体のカルシウム枯渇が誘導因子として重要であった。カルパイン阻害剤であるMDL28170により、カスパーゼ12の活性化は完全に抑制され、カスパーゼ12を介するアポトーシスシグナル経路の上流にはカルパインが位置することが示唆された。小胞体ストレス誘導因子であるサブシガージンによるアポトーシスは、カルパイン阻害剤によっても完全に抑制されず、非選択的カスパーゼ阻害剤によって抑制された。非選択的カスパーゼ阻害剤は、BAPTA/AM処置下でブラジキニン刺激時に生じるカスパーゼ非依存的なアポトーシスも阻害した。このことは、小胞体のカルシウム枯渇によって生じるアポトーシスは、カスパーゼ依存的ではあるがカスパーゼ12には非依存的なシグナル経路を介することが示唆された。

〔結論〕

本研究により血管内皮細胞におけるアポトーシスには、細胞内カルシウム濃度の上昇よりも、小胞体のカルシウム含量低下が誘導因子として重要であると考えられた。また小胞体ストレス誘導因子であるサブシガージン投与時のアポトーシス経路にはカスパーゼ12を介する経路のほかに、小胞体のカルシウム含量低下に続くカスパーゼ12非依存的な経路が存在することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞のアポトーシスが亢進すると血管内皮障害を起こし、その結果動脈硬化、高血圧を惹起する。血管内皮細胞のアポトーシスは小胞体ストレスによって誘導される。小胞体ストレスとして虚血、低酸素、低栄養などが要因として考えられるが、このような刺激を受けると小胞体はカスパーゼ、殊にカスパーゼ12を活性化し、アポトーシスを惹起することが知られている。一方、小胞体はカルシウムイオン貯蔵部位として重要な器官であり、細胞内カルシウム濃度を調節している。しかし小胞体ストレス応答時のカスパーゼと細胞内カルシウム関連については明らかでない。

申請者らは、血管内皮細胞の小胞体ストレスによるアポトーシス出現について、細胞内カルシウムとカスパーゼがいかなる関係にあるかを検討した。方法としては、ブタ下行大動脈から分離培養した血管内皮細胞を用いた。小胞体ストレスを起こす物質としてCa²⁺-ATPase阻害薬であるサブシガージンを用いた。細胞内カルシウムイオン濃度測定はFura-2/AMを用い、アポトーシスはDNAラダー法で、カスパーゼの活性化はウエスタンブロット法およびデンストメトリーにより解析した。またカルシウムインフラックスによって細胞内カルシウムイオンを上昇させるブラジキニンをサブシガージンの比較対照として用いた。

申請者らは以下のような結果を得た。

- (1) サブシガージンにより細胞内カルシウム濃度は上昇し、カスパーゼ12の活性化とアポトーシスの出現が認められた。このアポトーシスはカルパイン12阻害剤であるMDL28170存在下では出現したが、非選択的なカスパーゼ阻害剤であるz-VAD.fmkで前処理すると、アポトーシスは抑制された。
- (2) ブラジキニンは、細胞内カルシウム濃度を上昇させたが、カスパーゼ12の活性化もアポトーシスも生じなかった。しかし、小胞体カルシウムのキレート剤であるBAPTA/AMで前処置すると、小胞体の

持続したカルシウム枯渇を生じ、アポトーシスの出現が認められた。しかし、非選択的なカスパーゼ阻害剤であるz-VAD.fmkで、アポトーシスは抑制された。

申請者らが得られた結果をまとめると、サブシガージンsubsidinは小胞体カルシウム枯渇によるアポトーシスを誘導した。このアポトーシスは特異的カスパーゼ12阻害剤で完全には抑制されなかったが、非選択的なカスパーゼ阻害剤z-VAD.fmkで完全に抑制された。同様にブラジキニンとBAPTA/AMで小胞体カルシウム枯渇を枯渇させた状態で、z-VAD.fmkを投与するとアポトーシスは完全に抑制された。この研究の注目すべき点は以下の3点であろう。第1に血管内皮細胞のアポトーシスは細胞内カルシウム濃度の上昇よりも、小胞体のカルシウム枯渇が重要であることを見いだしたこと、第2にサブシガージンによるアポトーシスにはカスパーゼ12を介する経路のほかに、他のカスパーゼを介する経路があることを見いだしたこと、第3に血管内皮細胞のアポトーシスを抑制するためには広範囲にカスパーゼを抑制することを発見した点である。殊に第3の発見からは普遍的カスパーゼ抑制剤が血管内皮障害を改善することが予想され、将来の創薬につながる貴重な発見といえよう。

審査委員会は本論文について、次のような試問を行った。

- 1) ブタ下行大動脈の血管内皮細胞を用いた根拠について
- 2) アゴニスト濃度の設定法とサブシガージンとブラジキニンの作用機序の差異について
- 3) 小胞体ストレスに応じカスパーゼ12がアポトーシスを引き起こす機序について
- 4) カスパーゼ12の活性化機構と局在について
- 5) 大動脈と細小動脈の血管内皮細胞におけるアポトーシスの差異について
- 6) 虚血負荷と小胞体カルシウム枯渇の関連について
- 7) サブシガージンと類似薬理作用をもつ臨床薬について
- 8) サブシガージンによる小胞体カルシウム枯渇と小胞体から産生される異常蛋白の産生は連動するか否かについて
- 9) ブラジキニンの細胞膜受容体の構造と機能について

これらの試問に対して、申請者からは適切な解答が得られた。問題点も充分理解しており、このことより博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

| | | | | |
|---------|----|---------|----|---------|
| 論文審査担当者 | 主査 | 金 山 尚 裕 | | |
| | 副査 | 佐 藤 重 仁 | 副査 | 近 藤 一 直 |